

氏名	玉井 栄治
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬学
学位授与番号	博甲第 2072号
学位授与の日付	平成12年 3月 25日
学位授与の要件	自然科学研究科生体調節科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	大腸菌のmelibiose利用における新規温度感受性遺伝子発現制御系の 発見とメカニズムの解析
論文審査委員	教授 土屋友房    教授 早津彦哉    教授 山本重雄

### 学位論文内容の要旨

大腸菌K12株由来のW3133株におけるmelibioseの利用は、温度感受性(30℃では利用されるが37℃では利用できない)であることが知られている。Melibioseの利用が温度非感受性になった変異株W3133-2(37℃でも利用できる)と親株W3133を比較することにより温度感受性の原因とメカニズムの解明を試みた。当初、親株のmelibiose輸送タンパク質(MelB)が温度感受性であることが知られていたため、変異株W3133-2がmelibioseの利用に関して温度非感受性になった原因としてMelBの変異であると考えた。しかし、両株のMelBは、同一の温度感受性を示し、*melB*遺伝子の塩基配列も同じであった。一方、Northern blot解析により、親株W3133のmelibiose operonの発現は温度感受性であり変異株W3133-2のそれは温度非感受性であることがわかった。さらに解析を進めた結果、変異株W3133-2の*melAB*プロモーター領域に連続した5 bpの変異を発見した。変異株W3133-2では、この変異により*melAB*遺伝子の発現が温度に関わらず上昇しMelBの失活の速度を上回る速度で新たなMelBが合成されるためmelibioseの利用が温度非感受性になるものと思われる。さらに、*in vitro*解析によりその温度感受性遺伝子発現制御メカニズムの解明を行った。温度感受性及び温度非感受性*melAB*プロモーターを用いたgel retardation assayとそれらのDNase I footprintingにより、MelRのSite2'への結合が変異により上昇していることが明らかになった。これらのことより、この遺伝子発現が温度感受性を示すメカニズムは、温度によるMelRのSite2'への結合制御であることがわかった。私が発見した温度感受性*melAB*プロモーターの転写制御メカニズムはプロモーター領域の塩基配列に依存しているという大変ユニークなものでこれまでに報告のないものである。この新しい温度感受性プロモーターは、遺伝子発現の分子レベルでの解析とその応用に新しい局面を開くものである。

## 論文審査結果の要旨

細胞における遺伝子発現はさまざまな因子によって影響を受ける。大腸菌などに存在するメリビオースオペロンはメリビオースの利用に関与する二つのタンパク質、 $\alpha$ ガラクトシダーゼとメリビオース輸送タンパク質、をコードする二つの遺伝子 *melAB* を含んでいる。このオペロンの発現はメリビオース、グルコースなどによって調節されることが知られている。野生型大腸菌は摂氏37度以上ではメリビオースを利用することができない。著者はその温度感受性の理由としてメリビオースオペロンの発現が温度感受性であることを見いだした。そして温度非感受性変異株の解析から、メリビオースオペロンのプロモーター部位に5ヌクレオチドの連続した変異が入ることにより、このオペロンの発現が温度非感受性となることを見いだした。また *in vitro* 解析の結果、野生型と変異型では制御タンパク質 MelR のプロモーター部位への結合が温度によって大きな影響を受けることを明らかにした。さらに MelR の結合部位が4つあり、そのうちの最も下流側にある特異的な部位への結合のみが影響を受けることを明らかにした。こうして、制御タンパク質 MelR のプロモーター上の結合部位の構造が温度感受性を左右することを明らかにした。

以上のように、この研究により温度感受性遺伝子発現の制御に関する重要な知見が得られた。この論文は博士の学位に値するものと判断する。